

# MEDYCYNA WETERYNARYJNA

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA NAUK WETERYNARYJNYCH

CZASOPISMO POSWIĘCONE NAUCE I PRAKTYCE WETERYNARYJNEJ  
ZAŁOŻONE W 1945 R. PRZEZ WYDZIAŁ WETERYNARYJNY W LUBLINIE

## REDAKCJA

Redaktor naczelny: prof. dr Edmund PROST

Członkowie Komitetu Redakcyjnego: prof. dr Ryszard BADURA, prof. dr Jerzy MAZURCZAK,  
prof. dr Abdon STRYSZAK, doc. dr Stanisław WOŁOSZYN,

Sekretarz naukowy: dr Ryszard SŁUŻEWSKI.

## RADA PROGRAMOWA

Dr Anatol BACHAREWICZ, prof. dr. Henryk BALBIERZ, prof. dr Władysław BIELAŃSKI, prof. dr Stanisław CAKAŁA, prof. dr Zygmunt EWY, prof. dr Roman HOPPE, prof. dr Tadeusz JASTRZĘBSKI, prof. dr Lech JAŚKOWSKI, płk. doc. dr Stefan KOSSAKOWSKI, prof. dr Zdzisław LARSKI, dyr. dr Henryk LIS, dr Władysław LUTYŃSKI, prof. dr Wincenty PEZACKI, prof. dr Wiktor STEFANIAK, prof. dr Marian TRUSZCZYŃSKI, prof. dr Janusz WELENTO, prof. dr Aleksander ZAKRZEWSKI, prof. dr Eugeniusz ŻARNOWSKI.

## FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

T. MANN

### Postępy w biologii gamet. I. Problemy u samców \*)

Z Zakładu Fizjologii i Biochemii Sekcji Rolniczej Rady Naukowej w Cambridge (Wielka Brytania)

Przegląd zagadnień z zakresu biologii gamet, stosownie do życzenia organizatorów kongresu, będzie przedstawiony w dwóch częściach. Mnie przypada w udziale omówienie problemów związanych z komórkami rozrodczymi samca, a problemy dotyczące samicy przedstawi profesor Thibault.

Z przyjemnością skorzystałem z propozycji przygotowania tego referatu, gdyż odczuwam obecne zaproszenie jako znak ścisłej współpracy w zakresie biologii rozrodu między pracownikami nauki Krakowa i Cambridge. Wspólne wysiłki badawcze sięgają wielu lat wstecz. Jedno z owocnych osiągnięć wcześniejszej współpracy pozwolę sobie nazwać: jagnięciem — urodzonym przed 40-tu laty (w dniu 28.IV.1936 r.), a ochrzczonym „Lotnik”. Ojcem tego niezwykłego zwierzęcia był tryk rasy Suffolk, którego nasienie pobrał w Cambridge Artur Walton i przesyłką lotniczą w termosie z lodem wysłał do Polski, gdzie Roman Prawocheński z Uniwersytetu Jagiellońskiego użył je do zapłodnienia owcy rasy biała świniarka, która w wyniku tego pierwszego eksperymentu stała

się matką „Lotnika”. To jest chyba znamienne, że nasz gospodarz Władysław Bielański jest uczniem Prawocheńskiego i był także wprowadzony w badania nad plemnikami przez Waltona.

Od czasu szczęśliwego wydarzenia urodzenia „Lotnika” został dokonany wiele znaczący postęp w biologii nasienia, ale w moim referacie zamierzam omówić tylko niektóre kierunki jako przykłady dróg, którymi będzie obecnie postęp w badaniach nad nasieniem samców.

#### Podejście metodologiczne

Większość osiągnięć w ostatnich badaniach zostało dokonanych dzięki postępowi metodologicznemu. Pomiar koncentracji i ruchliwości plemników mogą być wykonane obecnie bardziej obiektywnymi metodami, z których ostatnio zasługuje na szczególną uwagę innowacja wprowadzona przy analizie obrazu plemników komputerem, albo specjalnym urządzeniem „Quantimet” (4). Wzrosło też zastosowanie mikroskopu elektronowego dzięki czemu ustalono zależności między różnymi typami nieprawidłowości w ejakulowanych plemnikach, a zaburzeniami w czasie spermatogenezy i dojrzewania

\*) Referat wygłoszony na VIII Międzynarodowym Kongresie Rozrodu i Sztucznego Unasienniania Zwierząt, Kraków 12–16. VIII.1976 r.

plemników w najądrzu. Ten sposób badania okazał się specjalnie wartościowym w badaniach przyczyn obniżonej płodności samców dużych zwierząt gospodarskich i zapewnia bardziej skuteczne wykorzystanie spermogramów (2).

Zarówno w badaniach ultrastruktury jak i biochemicznych zaznacza się wyraźnie przesunięcie punktu ciężkości z obserwacji całego plemnika na izolowane organella plemnika.

Stało się to możliwe dzięki rozwinięciu metod mechanicznego i chemicznego oddzielania błony komórkowej plemnika, akrosomów, jądra, mitochondriów, kropel cytoplazmatycznych i innych komponentów (axonem). Podobna tendencja zaznacza się w badaniach komórek rozrodczych przechodzących rozwój w jądrach (testes). Istotnie wzrasta wykorzystanie izolowanych kanalików nasieniowórczych dla badań nad spermatogenezą, a fragmenty komórek są używane do śledzenia biologicznych procesów związanych z poszczególnymi stadiami spermatogenezy — specjalna technika (Staput) umożliwiła rozdzielanie poszczególnych typów komórek rozrodczych w zależności od szybkości ich sedimentacji.

Hodowla tkanek jest dalszym przykładem przystosowania nowej drogi laboratoryjnej do badania komórek rozrodczych męskich. Należy tu cienkowarstwowa hodowla kanalików nasieniowórczych do wykazania tworzenia się testosteronu z najbliższych prekursorów steroidów (5); wysiłki te umożliwiły odtworzenie *in vitro* wczesnych stadiów spermatogenezy (13). Także powodzeniem zakończyły się eksperymenty z uzyskaniem hodowli tkankowych kanalików przewodu nasieniowodu w badaniach nad dojrzewaniem plemników (12).

### Nowe wiadomości dotyczące akrosomu i jądra plemnika

Na drodze łączenia obserwacji ultrastruktury z analizami biochemicznymi, został dokonany duży krok naprzód w badaniach nad dwoma głównymi składnikami główki plemnika tj. nad akrosomem i jądrem. Bardzo istotnym odkryciem stało się uzyskanie danych, że akrosom jest specjalną formą lizosomową, rozwiniętą dla umożliwienia penetracji plemnika do komórki jajowej (1).

Jednym z enzymów lizosomalnych akrosomu, który wydaje się być bezpośrednio związany z penetracją otoczki przejrzystej jest akrosin. Enzym ten może być unieczynniany przez inhibitory akrosinu, które występują w osoczu nasienia. Można przypuszczać że te inhibitory łączą się z akrosinem tylko w plemnikach uszkodzonych, albo ze zniszczonym akrosomem i że te inhibitory działają na drodze zapobiegania dostania się do komórek jajowych uszkodzonych plemników.

Odnosnie jądra plemnika i jego funkcji, zainteresowania przenoszą się z badań nad analizą DNA samej na badanie kompleksu DNA-

białko. W przeciwieństwie do wcześniejszych poglądów zmienność zawartości DNA jako takiej nie jest koniecznie związana z obniżoną płodnością samców zwierząt gospodarskich, a także okazało się, że nie istnieje istotna różnica w zawartości DNA między plemnikami normalnymi, a plemnikami o nienormalnym kształcie główki (7).

Natomiast okazało się, że niektóre formy obniżonej płodności u samców są związane z uszkodzeniem struktury kompleksu DNA-białko, co może występować albo w związkach między DNA a białkami jądra, albo w samym białku. Uważa się że w jądrach (*testis*) białko jądra komórkowego przechodzi serię kolejno fosforylacji i defosforylacji, w czasie których DNA-białko staje się stopniowo bardziej ściśle i bardziej stabilne.

Równocześnie obniża się zdolność jądra komórkowego plemnika do barwienia się odczynikiem Feulgena. W przeciwieństwie do dawnych poglądów obecnie wiemy, że obniżenie się wrażliwości na to barwienie nie jest spowodowane przez redukcję zawartości DNA, ale jest wynikiem zmian w stanie wiązań DNA-białko (6). Zmianom tym przypuszczalnie towarzyszą również przekształcenia wiązań białkowych Sh w mostki S-S.

Specjalne zainteresowanie budzi odkrycie, że można rozróżnić ludzkie plemniki, które są nośnikami x i y chromosomów, na drodze badania i właściwości fluorescencyjnych w świetle ultrafioletu po zabarwieniu kwinaakryną (quinacrine mustard).

Jeżeli podobne właściwości udałoby się wykazać w plemnikach zwierząt gospodarskich, to prowadziłyby to do rozwinięcia szybkich prób plemników zawierających x i y chromosom do odpowiednich frakcji nasienia przygotowanego do sztucznego unasieniania. Dotychczas jednak nie udało się uzyskać zadowolającego rozdzielania na drodze elektroforezy, sedimentacji i innych metod. Bardziej obiecującym podejściem może być użycie specyficznych antygenów plemników; taka metoda w zastosowaniu do myszy, podawana jest jako częściowo skuteczna.

### Głębokie zamrażanie nasienia

O historycznym znaczeniu jest wiadomość, że niektóre próbki nasienia buhaja, które były zadržane glicerolem i przechowywane w CO<sub>2</sub> (—79°C) przez prawie ćwierć wieku zawierają jeszcze żywe plemniki i użyte do sztucznego unasieniania pozwalają na produkcję normalnego przychowku. Na przestrzeni ubiegłego okresu czasu, liczne usprawnienia zostały dokonane w przechowywaniu nasienia mrożonego, a użycie płynnego azotu (—196°C) jest ogólnie stosowaną metodą w praktyce. Mimo tego pozostają jeszcze niektóre nierozwiązane problemy w przechowywaniu nasienia. Jednym z takich jest występowanie różnic w „zamrażalności” nasienia pobieranego od poszczególnych

zwierząt tego samego gatunku co zostało wykazane w eksperymentach Stewarta i wsp. (14) nad unasienianiem krów mieszanym nasieniem. Przy unasienianiu nasieniem świeżym, zawierającym równą ilość plemników od 4 buhajów okazało się, że liczba potomstwa uzyskanego po każdym z nich była taka sama, ale kiedy krowy były unasieniane nasieniem tych samych buhajów, ale poprzednio zamrożonym przed zmieszaniem, jeden z 4 buhajów był ojcem aż 50% potomstwa. Także brak nam zadowolającej odpowiedzi na pytanie dlaczego nasienie, które po rozmrożeniu wykazuje zadowolający ruch plemników, niekoniecznie musi posiadać zdolność do zapłodnienia. To zagadnienie dotyczy w wysokim stopniu nie tylko zwierząt gospodarskich, a także człowieka, gdyż następstwa mogą być znacznie groźniejsze ze względu na ewentualne uszkodzenia genetyczne ojcowskiej chromatyny na skutek zamrażania i rozmrażania nasienia.

Każdy gatunek pod tym względem wykazuje specyficzny problem i miary skuteczności osłaniania plemników buhaja przed uszkodzeniem w czasie zamrażania i rozmrażania nie mogą być stosowane do człowieka. Podobna sytuacja jest w odniesieniu do wrażliwości na wstrząs chłodowy. Uważa się, że plemniki człowieka znoszą nagle ochłodzenie do temp. nieco ponad 0°C znacznie lepiej niż plemniki buhaja, ale plemniki knura są najbardziej wrażliwe na schładzanie, nawet jeżeli ten proces przebiega stosunkowo powoli.

Także skuteczność osłaniających dodatków jest różna u poszczególnych gatunków. U knura spośród kilku badanych fosfolipidów, seryna fosfatydylowa okazała się najbardziej skuteczną na osłonie plemników przeciwko niekorzystnym efektom zamrożenia (3).

W naszym laboratorium poświęcono wiele wysiłków dla zbadania jakie biochemiczne mechanizmy biorą udział w procesie starzenia się plemników w czasie ich przechowywania, a także w rezultacie wstrząsu chłodowego (8, 10, 15).

Między innymi stwierdziliśmy, że wyciekanie międzykomórkowych składników ważnych życiowo, takich jak cykliczny monofosforan adenozyny, jest jednym ze zjawisk związanych ze starzeniem się plemników. Tworzenie się nadtlenków lipidowych (lipid peroxides) z plazmalogenu plemnika jest inną charakterystyczną zmianą, która występuje w czasie przechowywania plemników w warunkach tlenowych.

### Porównawcze aspekty biologii plemnika

Jak wszędzie w biologii znaczenie podejścia porównawczego do problemów związanych z gametami męskimi, zostało wcześniej docenione. Pogląd ten znalazł gorących obrońców między licznymi pionierami, włączając w to Emila Godlewskiego, którego pracownia w Krakowie wniosła pod tym względem wiele cennych danych. Od tego czasu ogromne postępy zosta-

ły dokonane w badaniach porównawczych na plemnikach, których przegląd został podany w 1975 r. w publikacji Linnean Society w Londynie w dziele „The Biology of the Male Gamete” — materiały te obejmują nie tylko zwierzęta ale gamety roślin.

Przy wysuwaniu ogólnych hipotez, związanych z takimi zjawiskami jak ruchliwość plemników, przeżywalność albo metabolizm musimy być specjalnie ostrożni. W związku z tym chciałbym wspomnieć o moich własnych doświadczeniach. W mojej wcześniejszej pracy z nasieniem buhaja i tryka mogłem wykazać, że plemniki mogą przeżywać beztlenowo przekształcając cukier nasienia, fruktozę w L (+) kwas mlekowy (9), ale ostatnio w czasie badań nad beztlenowym przeżywaniem plemników u Octopusa w Północnym Pacyfiku stwierdziliśmy, że te plemniki mogą korzystać z innego metabolizmu, przekształcając glikogen w D (—) kwas mlekowy (11).

Ten może niepełny przegląd kilku ostatnich osiągnięć w biologii gamet męskich mam nadzieję da pewien wgląd w drogi, którymi biegnie postęp w tej dziedzinie.

### Piśmiennictwo

1. Allison A. C., Hartnes E. F.: J. Reprod. Fert. 21, 501, 1970.
2. Blom E.: Nord. Vet.-Met. 25, 383, 1973.
3. Godowicz B., Krzanowska H.: Folia Biol. 14, 235, 1966.
4. Butler W. J., Roberts T. K.: J. Reprod. Fert. 43, 183, 1975.
5. Dott H. M.: J. Reprod. Fert. 45, 47, 1975.
6. Dufau M. L., de Kretser D. M., Hudson B.: Endocrinol. 88, 825, 1971.
7. Gledhill B. L.: J. Reprod. Fert. Suppl. 13, 77, 1971.
8. Jones R., Krzanowska H.: Folia Biol. 14, 235, 1966.
9. Jones R., Mann T.: W druku (1976).
10. Mann T.: The biology of semen and of the male reproductive tract. Me thuen. London 1964.
11. Mann T., Lutwak-Mann C.: Biochemical aspects of ageing in spermatozoa in relation to motility and fertilizing ability. W książce Aging Gametes. Blandau R. J., Basel. 1975.
12. Mann T., Martin A. W., Thiersch J. B., Lutwak-Mann C., Brooks D. E., Jones R.: Science 185, 453, 1974.
13. Orgebin-Crist M. C., Tichenor P. L.: Nature 239, 227, 1972.
14. Steinberger E., Steinberger A., Ficher M.: Rec. Progr. Horm. Res. 26, 547, 1970.
15. Stewart D. L., Spooner R. L., Bennett G. H., Beatty R. A., Hancock J. L.: J. Reprod. Fert. 36, 107, 1974.
16. Tash J. S., Mann T.: Proc. Roy. Soc. B. 184, 109, 1973.

Tłumaczył: Władysław Bielański

**HARKNESS J. W., PATTISON A. M., SCOTT A. C.:  
Wirus zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza: morfologia wirusa w mikroskopie elektronowym po wybarwieniu negatywnym. (Infectious bursal disease agent: morphology by negative stain electron microscopy). Archives Virology, 48, 63—75, 1975 (1).**

Wirus zakaźnego zapalenia torby Fabrycego w preparatach z mikroskopu elektronowego wybarwionych negatywnie występuje jako drobne cząsteczki o wymiarach 18—20 nm i jako cząsteczki większe o wymiarach 55—64 nm. Wirion o kształcie heksagonalnym zawiera 4 identyczne jednostki ułożone na krawędzi heksagonu. Kapsomery o wymiarach 8—9 nm mają kształt sferyczny lub cylindryczny. W preparatach wirusa oczyszczanych w gradiencie sacharozy cząsteczki wirusa są otoczone błoną komórkową, która tworzy pseudo otoczkę. Badania w dużym powiększeniu wykazały, że małe cząsteczki składają się z 4 podjednostek o średnicy równej średnicy kapsomerów, wchodzących w skład dużych cząsteczek wirusowych. Morfologia wirusa zapalenia torby Fabrycjusza w preparatach wybarwionych negatywnie wykazuje duże podobieństwo z morfologią wirusa bleutongue i wirusa martwicy trzustki pstrąga.

G.